

Quantitative Bestimmung
des Aminostickstoffes der freien Aminosäuren
und der Peptide in der Glaskörperflüssigkeit
des Auges von Schwein und Rind

Georg Kalfhaus

Aus der Augenklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. med. W. Rohrschneider

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES AMINOSTICKSTOFFES DER FREIEN
AMINOSÄUREN UND DER PEPTIDE IN DER GLASKÖRPERFLÜSSIGKEIT
DES AUGES VON SCHWEIN UND RIND

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Georg Kalfhaus
Lünen/Westf.

München 1959



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Dozent Dr. H. J. Küchle
Korreferent: Professor Dr. med. W. Rohrschneider
Dekan: Professor Dr. med. K. Kolle

Tag der mündlichen Prüfung: 20. März 1959

Meinen lieben Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Bisheriges einschlägiges Schrifttum	2
III. Methodik der eigenen Untersuchung	5
1. Bestimmung des Carboxylstickstoffes	5
2. Apparate	6
3. Reagentien	6
4. Experimentelles Vorgehen	6
5. Destillation der CO ₂	7
6. Leeranaysen	7
7. Titration	8
8. Berechnung des Carboxylkohlenstoffes und Carboxylstickstoffes	8
9. Quantitative Bestimmung des Aminostick- stoffes der freien Aminosäuren in der Glas- körperflüssigkeit von Rinder- und Schweine- augen	9
10. Quantitative Bestimmung des Aminostickstoff- gehaltes der Peptide in der Glaskörperflüssigkeit von Rinder- und Schweineaugen	10
IV. Ergebnisse der eigenen Untersuchungen	11
1. Aminostickstoffgehalt der freien Aminosäuren	11
2. Aminostickstoffgehalt der Peptide	12
V. Besprechung der Ergebnisse	13
Zusammenfassung	15
Literaturverzeichnis	16
Lebenslauf	19

I. E I N L E I T U N G

Die Aufklärung der chemischen Natur des Glaskörpers ist insofern von besonderer Wichtigkeit, als es in der Ophthalmologie verschiedene Zustände desselben gibt, die einen Ersatz notwendig machen. So etwa wäre es ein Fortschritt, wenn es gelänge, einen Glaskörper, der durch Entzündungen oder degenerative Vorgänge getrübt worden ist, durch klaren Glaskörper zu ersetzen. Auch nach Operationen, zum Beispiel der Ablatio retinae, ist es oftmals notwendig, den dabei entstandenen Verlust an subretinaler Flüssigkeit wieder auszugleichen.

Weve empfiehlt, zu diesem Zwecke Glaskörperflüssigkeit zu verwenden. Eine Voraussetzung für das Arbeiten mit frischem oder auch einige Zeit aufbewahrttem Glaskörper ist natürlich eine genaue Kenntnis der chemischen Zusammensetzung desselben. Bekanntlich besteht der Glaskörper zu seinem größten Teil aus Kohlenhydraten. Sein typischer Quellungsdruck wird insbesondere durch die Hyaluronsäure, die durch die Hyaluronidase in bestimmtem Quellungsdruck gehalten wird, aufrechterhalten. Neben diesem Kohlenhydratanteil enthält der Glaskörper aber auch noch einen Proteinanteil. Einerseits handelt es sich dabei um Fermenteiweiß; andererseits dürfen wir aber annehmen, daß es sich auch um Eiweiß handelt, das an der Bildung der strukturierten Anteile beteiligt ist. Da das Protein aus einzelnen Aminosäuren aufgebaut wird, schien uns die Untersuchung der freien Aminosäuren und der nächst höheren Stufe beim Eiweißaufbau, nämlich der Peptide, von Interesse. Wegen der Schwierigkeit, menschliche Glaskörper in frischem Zustande und in genügender Menge zu bekommen, haben wir uns, wie fast alle Voruntersucher, mit Rinderglaskörpern beschäftigt, außerdem aber auch noch den Glaskörper von Schweineaugen untersucht. Durch Filtration kann der Glaskörper in einen nicht flüssigen und einen flüssigen Anteil, die sogenannte Glaskörperflüssigkeit getrennt werden. Der eigentliche Glaskörper, welcher beim frisch enucleierten Auge fest mit Ciliarkörper und Ora serrata verbunden ist, zeigt eine zusammenhängende Struktur. In den bisherigen zahlreichen Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung des Glaskörpers und auch der sogenannten Glaskörperflüssigkeit ist über eine genauere quantitative Analyse der einzelnen in der Glaskörperflüssigkeit des Rinderauges vorkommenden freien Aminosäuren bisher nur von Wootton, Young und Williams berichtet worden.

In der vorliegenden Arbeit sind nicht die einzelnen Aminosäuren der Glaskörperflüssigkeit quantitativ bestimmt worden, sondern es wurde eine quantitative Untersuchung des Gesamtstickstoffes der freien Aminosäuren ausgeführt. Deren Ergebnis läßt sich mit der aus der Tabelle von Wootton und Mitarbeitern errechneten Stickstoffmenge vergleichen. Weiterhin ermöglicht die Untersuchung der

Glaskörperflüssigkeit vom Schwein die entsprechenden Verhältnisse mit denen des Rinderglaskörpers zu vergleichen.

II. BISHERIGES EINSCHLÄGIGES SCHRIFTTUM

Wootton und Mitarbeiter untersuchten die freien Aminosäuren der Glaskörperflüssigkeit mittels Ionenaustausch und nachfolgender Papierchromatographie (Tabelle 1). Dabei erweist sich das Aminosäurespektrum des Glaskörpers als ein Ultrafiltrat des Blutes, obgleich die relative Konzentration niedriger zu sein scheint. Gewisse qualitative und quantitative Differenzen erklären sich aus der Anwendung verschiedener chromatographischer Methoden.

TABELLE 1
(Nach Wootton, Young und Williams)
Gehalt der Glaskörperflüssigkeit des Rinderauges an freien
Aminosäuren in mg pro 100 ml

Aminosäure	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4 im Blutserum
Taurin	2,4	1,5	2,3	0,7
Asparagin	0,2	-	0,2	0,1
Threonin	0,9	0,2	0,8	0,7
Serin	0,9	0,8	1,8	1,4
Asparaginsäure	0,9	0,8	1,8	1,4
Glutamin	2,0	4,0	0,6	1,3
Aminoessigsäure	0,7	0,6	0,6	2,4
Alanin	1,3	1,3	1,3	2,5
Valin	1,0	1,8	1,6	2,2
Methionin	0,2	-	0,1	0,2
Isoleucin	0,5	0,9	0,9	0,8
Leucin	0,9	0,9	1,4	1,6
Tyrosin	0,4	-	0,8	0,5
Phenylalanin	0,6	-	1,0	1,2
Histidin	0,4	0,2	0,3	0,3
Lysin	0,8	0,4	0,2	0,3
Arginin	-	-	1,1	-

Rechnerisch ergibt sich, daß Probe I 1,532 mg, Probe II 1,354 mg, Probe III 0,906 mg und Probe IV 2,221 mg Aminostickstoff in 100 ml Glaskörperflüssigkeit bzw. Blutserum (Probe IV) enthält.

Cohen, Killian und Metzger bestimmten dagegen den Aminostickstoffgehalt in der Glaskörperflüssigkeit verschiedener Tiere wie auch im Blut des Menschen und im Liquor cerebrospinalis, und zwar nach einer von Folin angegebenen Farbreaktion. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

TABELLE 2
(Nach Cohen, Killian und Metzger)

Aminostickstoffgehalt in mg in 100 ml Glaskörperflüssigkeit			Aminostickstoffgehalt in mg in 100 ml	
			Blut	Liquor cerebrospinalis
Rind	Schwein	Pferd	Mensch	Mensch
1,8	2,8	2,1-3	5,7	2,4

Eine qualitative Bestimmung der freien Aminosäuren in den intraokulären Flüssigkeiten und im Blut mittels Papierchromatographie wurde bereits von Malatesta vorgenommen. Aus dieser Arbeit stammt die Tabelle 3. Die papierchromatographische Untersuchung der freien Aminosäuren gibt aber nicht nur Auskunft über die qualitative Zusammensetzung einer Analysenlösung, sondern zeigt auch, in welchem Verhältnis die freien Aminosäuren ungefähr zueinander stehen, da die Größe und Intensität der Farbflecke des Chromatogramms ja von der Menge der einzelnen Aminosäuren abhängig ist. Zum Vergleich werden deshalb die verschiedenen Konzentrationsstärken durch + - Zeichen angegeben. Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß sich die flüssige Fraktion des Glaskörpers genau so verhält, wie das Kammerwasser, während im Chromatogramm der halbfesten Fraktion des Glaskörpers einige freie Aminosäuren fehlen. Auch ist die Konzentration der Aminosäuren der halbfesten Glaskörperfraktion niedriger als die des Kammerwassers und des flüssigen Teiles des Glaskörpers.

TABELLE 3
(Nach Malatesta)

Aminosäuren	Blut	Kammerwasser	Glaskörper (halbfeste Phase)
Phosphoserin	+++	++	-
Phosphocolamin	+	-	-
Lysin	+	+	-
Asparaginsäure	++	+	+
Glutaminsäure	++	++	++
Alanin	++	++	++
Glycin	++	++	++
Glutamin	++	++	++
ℒ -Alanin	+	-	-
Arginin	+	+	-
Serin	++	++	++
Threonin	+	+	-
ℒ -Aminobuttersäure	+	+	-
Prolin	+	-	-
Taurin	++	++	++
Valin	++	++	++
Leucin	++	++	Spuren
Tyrosin	+	-	-
Phenylalanin	+	Spuren	-

Das Chromatogramm der flüssigen Fraktion des Glaskörpers entspricht dem des Kammerwassers. Beim Vergleich mit Tabelle 1 ergibt sich, daß von Malatesta Asparagin, Aminoessigsäure, Alanin, Methionin, Isoleucin und Histidin im Gegensatz zu Wootton und Mitarbeitern nicht gefunden wurden, während bei Wootton und Mitarbeitern Phosphoserin, Phosphocolamin, Glutaminsäure, Glycin, ℒ -Aminobuttersäure und Prolin nicht erwähnt werden. Der Gehalt an freien Aminosäuren dürfte demnach wohl höher sein als von Wootton und Mitarbeitern angegeben worden ist.

Eine Untersuchung des Stickstoffgehaltes der Peptide des Glaskörpers ist bisher nicht unternommen worden, wohl wegen der großen Ungenauigkeiten, die durch Hydrolyse entstehen. Beim Kochen mit starken Säuren oder Basen erleiden nämlich die Aminosäuren mehr oder weniger weitgehende Racemisierung und chemische Veränderungen, besonders in Anwesenheit größerer Kohlenhydratmengen,

wie das ja im Glaskörper der Fall ist. Es gibt nur einige wenige einfache Aminosäuren, die nicht durch hohe H- oder OH-Ionenkonzentration in der Hitze mit der Zeit mehr oder weniger tiefgreifende Veränderungen erfahren, vor allem in Anwesenheit von Kohlenhydraten. Zum Beispiel hat K o t a k e festgestellt, daß in Gegenwart von Kohlenhydraten Tryptophan bei saurer Hydrolyse vollkommen zerstört wird, während diese Aminosäure in reiner Form beim Kochen mit hochprozentigen Säuren ziemlich stabil ist. Eine von Halwer durchgeführte Untersuchung des Cysteinverlustes bei saurer Hydrolyse ergab, daß auch dabei Kohlenhydrat eine Rolle spielt. Untersuchungen von T r i s t r a m zeigten, daß die Hexonbasen, besonders Arginin und Histidin beim Kochen in saurer Lösung mit Kohlenhydrat ebenfalls Veränderungen erleiden, die bis zu 20 % Verlust führen.

Es wurde dennoch der Versuch unternommen, den Stickstoffgehalt auch der Peptide quantitativ zu bestimmen; die Ergebnisse werden dabei nach dem Gesagten einen Mindestgehalt darstellen; in Wirklichkeit dürfte er etwa 10 bis 20 % höher liegen.

III. METHODIK DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN

1. Bestimmung des Carboxylstickstoffes

Die beim Umsatz von Ninhydrin mit Aminosäuren gebildete CO_2 -Menge ist quantitativ und stellt ein Maß für die Anzahl der α -Aminogruppen dar. Alle Aminosäuren entwickeln je Mol 1 Mol CO_2 , bis auf Asparaginsäure und Glutaminsäure, die 2 Mol CO_2 abgeben.

Nach van Slyke, Fayden und Hamilton läßt sich das beim Erhitzen der Komponenten bei mäßig saurem pH entwickelte CO_2 manometrisch oder titrimetrisch bestimmen, wobei im Rahmen der hier erfolgten Bestimmung aus methodischen Gründen das letztere Vorgehen gewählt wurde. Bei der titrimetrischen Methode wird das durch Decarboxylierung der Aminosäuren gewonnene CO_2 mit standardisierter Bariumhydroxydlösung zusammengebracht. Die Titration erfolgt mit standardisierter Salzsäure. Aus der gebildeten CO_2 -Menge läßt sich der Aminostickstoff errechnen. Den Kohlenstoff der Carboxylgruppe bezeichnet van Slyke als Carboxylkohlenstoff, eben weil es sich um das C-Atom der Carboxylgruppe handelt, den Aminostickstoff als Carboxylstickstoff, da die Stickstoffbestimmung über die Reaktion der Carboxylgruppe erfolgt.

2. Apparate

1. Zwei 25 cm³ Erlenmeyerkolben, die durch ein U-Rohr miteinander verbunden sind (Abb. 1). Die Befestigung am U-Rohr erfolgt durch Gummistöpsel. Der äußere Durchmesser der Endstücke des U-Rohres und der Kolbenhäse beträgt 16 mm.
2. Eine 5 cm³ Burette mit einer Genauigkeit von 0,01 cm³.
3. Ein Behälter mit CO₂-freier Luft. Hier wurde ein Luftballon mit einem Dreiwegehahn versehen und mit Stickstoff gefüllt.
4. Eine Wasserstrahlpumpe und eine Vakuumflasche.
5. Ein Wasserbad.
6. Bei der Bestimmung des Aminostickstoffes der Peptide: Rückflußkühler, Liebig-Kühler und 250 cm³-Kolben.

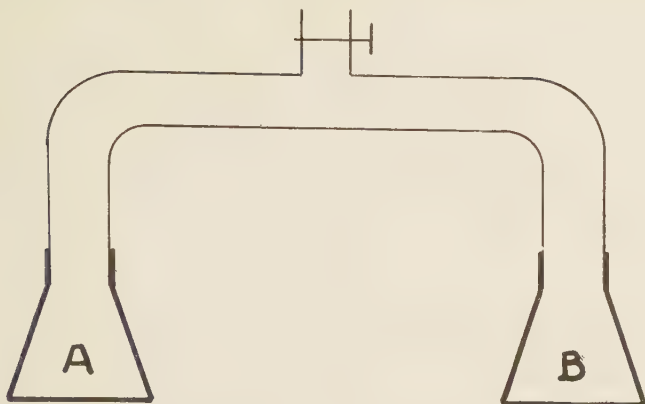
3. Reagentien

1. Ninhydrin.
2. Citratpuffer, um ein pH von 4,7 zu erhalten: 17,65 g Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O werden mit 8,40 g Citronensäure vermischt, im Achtmörser verrieben und bei 100° in einer Schliffflasche getrocknet.
3. Octylalkohol zur Verhinderung einer Schaumbildung.
4. 0,02855 n Salzsäure zur Titration.
5. 0,125 n Bariumhydroxydlösung, die 2 % BaCl₂ enthält. BaCl₂ wird hinzugefügt, um einen vollständigen Niederschlag von BaCO₃ zu erhalten. Es wird eine 0,15 n Lösung von Ba(OH)₂ hergestellt und 5 Volumenteile dieser Lösung werden mit einem Volumenteil einer 12 %igen BaCl₂-Lösung gemischt.
6. Phenolphthalein als Indikator.
7. Alkoholus absolutus zum Enteiweißen der Glaskörperflüssigkeit.
8. 1 n Natronlauge zur Neutralisation.
9. Azeotrope Salzsäure für die Hydrolyse.

4. Experimentelles Vorgehen (Reaktion mit Ninhydrin)

Ins Reaktionsgefäß A gibt man bis zu 5 ml der auf pH 4,7 mit Citrat gepufferten Analysenlösung. Um beim Erhitzen ein Schäumen zu verhindern, wird die Lösung mit einem Antischaummittel, hier Octylalkohol, versetzt. Zur Entfernung von CO₂ kocht man kurz auf, verschließt anschließend den Kolben mit einem Gummistöpsel und kühlt die Analysenlösung auf 15° C ab. Dann wird das Kölbchen B mit CO₂-freiem Gas, in unserem Falle Stickstoff, durchspült und während des Hindurchströmens des Stickstoffes 1 ml der $\frac{n}{8}$ Ba(OH)₂-Lösung hinzugegeben.

Abbildung 1



Der Kolben wird ebenfalls mit einem Gummistöpsel verschlossen. Zu der Analysenlösung im Kolben A gibt man nun 100 mg Ninhydrin. Beide Kolben werden schnell mit der U-Röhre verbunden und die Apparatur wird durch eine Wasserstrahlpumpe sofort evakuiert. Darauf wird der Hahn geschlossen und die Apparatur bis zum Hahn des U-Rohres für 10 Minuten in das kochende Wasserbad gesetzt. Die Ninhydrinreaktion ist gekennzeichnet durch das Auftreten einer Violettfärbung beim Erhitzen.

5. Destillation der CO_2

Zur Destillation der CO_2 mit dem größten Teil des Wassers von A nach B wird der Kolben B einfach über den Rand des Wasserbades gehoben und in ein Gefäß, das kaltes Wasser enthält, getaucht, während der Kolben A im kochenden Wasser bleibt. Die Destillationszeit beträgt 3 Minuten. Während der Destillation wird der Kolben B dauernd geschüttelt, damit die CO_2 vollständig absorbiert wird. Nach Beendigung der Destillationszeit wird der Apparat abgekühlt und anschließend mit Stickstoff gefüllt. Die Klemme wird dann wieder geschlossen und die Apparatur bleibt bis unmittelbar vor der Titration ungeöffnet.

6. Leer - Analyse

Im Rahmen jeder Versuchsreihe (bei unseren Versuchen wurden jeweils vier Kölbchenpaare zusammen in das Wasserbad gebracht) wird eine Leer-Analyse ausgeführt, und zwar mit dem gleichen Volumen Wasser an Stelle der Aminosäurenlösung. Bei der Leer-Analyse werden alle Reagentien außer Ninhydrin

gebraucht. Ninhydrin entwickelt selbst keine CO_2 , kann daher also fortbleiben.

7. Titration

Die Titration wird ausgeführt mit einer 0,02855 n Salzsäure. Als Indikator dient Phenolphthalin. Während des Titrierens strömt ununterbrochen Stickstoff durch die $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung.

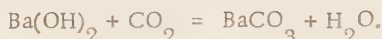
8. Berechnung des Carboxylkohlenstoffes und Carboxylstickstoffes

T_1 sei der Verbrauch an $\frac{n}{35}$ HCl-Lösung in ml bei der Leer-Analyse, T_2 der bei der Aminosäurenanalyse. Das Ergebnis ergibt sich aus der Formel:

$$\text{mg Carboxylkohlenstoff} = (T_1 - T_2) \cdot \text{Faktor.}$$

Der Faktor wird folgendermaßen bestimmt:

1 Mol $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (171,37 g) reagiert mit 1 Mol CO_2 (44,01 g) unter Bildung von BaCO_3 und H_2O .



Eine $\frac{n}{8}$ -Bariumhydroxydlösung enthält 10,71 g $\text{Ba}(\text{OH})_2$ im Liter Lösung. In 1 ml der Lösung sind dann 0,01071 g $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Reagieren 171,37 g $\text{Ba}(\text{OH})_2$ mit 44,01 g CO_2 , so reagieren 0,01071 g $\text{Ba}(\text{OH})_2$ mit 0,0027505 g = 2,7505 mg CO_2 . Da 0,01071 g $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (enthalten in einem ml einer $\frac{n}{8}$ -Lösung) mit 2,7505 mg CO_2 reagieren, kann man aus der zur Neutralisation der $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung im Kolben B gebrauchten Salzsäure ersehen, wieviel mg CO_2 in die Bariumhydroxydlösung gelangt sind. Zur Neutralisation von 1 ml einer $\frac{n}{8}$ -Bariumhydroxydlösung werden 4,375 ml einer $\frac{n}{35}$ Salzsäurelösung gebraucht. Wird nun 1 ml der $\frac{n}{35}$ HCl-Lösung (das ist $\frac{n}{35}$ der 4,375. Teil) benötigt, so bedeutet das, daß 0,62869 mg CO_2 (der 4,375. Teil der CO_2 -Menge, die mit 1 ml $\frac{n}{8}$ $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung reagieren kann) in die Bariumhydroxydlösung gelangt sind. Der gewichtsmäßige Anteil des Kohlenstoffes an der Carboxylgruppe beträgt $\frac{3}{11}$. Beim Verbrauch von 1 ml Salzsäure entfallen also $\frac{3}{11}$ von 0,62869 mg CO_2 auf den Kohlenstoff, das sind 0,1715 mg. Der Faktor zur Berechnung des Carboxylkohlenstoffes beträgt demnach 0,1715. Der Faktor zur Bestimmung des Carboxylstickstoffes ist um $\frac{14}{12}$ (Atomgewicht von N) größer als der des Carboxylkohlenstoffes, er beträgt also 0,2.

9. Quantitative Bestimmung des Aminostickstoffes in der Glaskörperflüssigkeit von Rinder- und Schweineaugen

Innerhalb von 4 - 8 Stunden nach Entfernung der Augen von den frisch getötenen Tieren wurde der Glaskörper ausgelöst und durch Abnutschen die Flüssigkeit vom Gerüst getrennt. Mit einer Pipette wurden 10 ml der Glaskörperflüssigkeit dem Behälter entnommen und zur Eiweißfällung mit 40 ml Äthylalkohol versetzt, so daß das Gemisch 80 % Alkohol enthielt. Nach kurzem Aufkochen wurde das ausgefällte Eiweiß wiederum durch eine Nutsche abfiltriert und das klare Filtrat bis auf 5 ml eingedampft, so daß, da der Alkohol ja zuerst verdampft, wieder reine Glaskörperflüssigkeit, allerdings in konzentrierter Form, vorlag. Zunächst ausgeführte Versuche mit einer geringeren Glaskörpermenge (2-3 ml) ergaben, daß der Aminostickstoffgehalt dabei zu gering war, um ihn mit der benutzten Methode zu bestimmen. Dieses Verfahren ist nämlich nur geeignet für Analysenlösungen, die mehr als 0,15 mg Stickstoff enthalten. Aus diesem Grunde wurden zu jeder Analyse 10 ml Glaskörperflüssigkeit verwendet und diese auf 5 ml eingedampft, weil nach van Slyke nicht mehr als 5 ml Analysenlösung genommen werden sollen. Zur Gewinnung von 10 ml Schweineglaskörperflüssigkeit waren etwa 4 Schweineaugen notwendig. Die entsprechende Menge Rinderglaskörperflüssigkeit konnte aus einem Rinderauge gewonnen werden. Die Glaskörperflüssigkeit wurde dann in das Reaktionskölbchen A gegeben, 100 mg Citratpuffer, um einen pH von 4,7 zu erhalten, einige Tropfen Octylalkohol, zur Verhinderung einer Schaumbildung und einige Körnchen Bimsstein, zur Vermeidung von Siedeverzug wurden hinzugegeben. Zur Entfernung von CO_2 wurde die Glaskörperflüssigkeit kurz aufgekocht, der Kolben danach sofort mit einem Gummistöpsel verschlossen und die Lösung auf 15° C abgekühlt.

Nachdem durch den Kolben B etwa 250 ml CO_2 -freien Gases, in unserem Falle Stickstoff, geströmt waren und dadurch der Kolben frei von atmosphärischer CO_2 war, wurde 1 ml der $\frac{1}{8}$ Ba(OH) $_2$ -Lösung hineingegeben. Währenddessen strömt weiterhin ununterbrochen Stickstoff durch den Kolben. Der Kolben B wurde dann ebenfalls verschlossen. Der weitere Verlauf ist so, wie er bei der Beschreibung der Methode angegeben worden ist. Zu erwähnen ist lediglich noch die Auffüllung der Apparatur mit Stickstoff nach der Destillation der CO_2 und der anschließenden Abkühlung. Zu diesem Zwecke wurde ein mit Stickstoff gefüllter Gummiballon mit einem Dreiwegehahn versehen. Von den zwei noch freien Schenkeln desselben wurde der eine mittels einer Gummimanschette mit dem U-Rohr, der andere mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden. Zunächst wurde der Hahn so gestellt, daß ein Vakuum in dem Leitungssystem entstand und dann eine Verbindung zwischen Gummiballon und der Apparatur hergestellt. Nun konnte Stickstoff in die Apparatur strömen. Anschließend wurde

der Hahn des U-Rohres wieder geschlossen. Auf diese Art und Weise wurde das Einströmen von Luft und damit auch von atmosphärischer CO_2 in die Apparatur verhindert.

Die Berechnung des Aminostickstoffgehaltes erfolgt nach der Formel:

$$\text{mg Carboxyl - N} = (T_1 - T_2) \cdot 0,2.$$

10. Quantitative Bestimmung des Aminostickstoffgehaltes der Peptide in der Glaskörperflüssigkeit von Rinder- und Schweineaugen

Bei der Untersuchung des Aminostickstoffgehaltes der Peptide wurden 20 ml Glaskörper mit 80 ml Alkohol versetzt, so daß auch hier wieder das Gemisch 80 % Alkohol enthielt. Nach kurzem Aufkochen wurde das Eiweiß abfiltriert und nun das Gemisch in zwei Hälften geteilt, von denen die eine zur Bestimmung des Aminostickstoffgehaltes vor, die andere zur Bestimmung nach der Hydrolyse verwandt wurde. Aus der Differenz ergab sich dann der Gehalt der Peptide an Aminostickstoff. Die zur Hydrolyse bestimmte Menge wurde zunächst in einen 250 ml Kolben gegeben, fast bis zur Trockne eingedampft und mit 50 ml azeotroper Salzsäure versetzt. Auf den Kolben wurde dann ein Rückflußkühler gesetzt. Die Hydrolysenzeit betrug 6 Stunden. Danach wurde die Salzsäure zum größten Teil abgejagt. Zu diesem Zwecke wurde der Kolben mit einem eingeschliffenen Aufsatz versehen, der oben zwei Öffnungen hatte, und zwar eine, die durch eine Kapillare die Verbindung mit der Außenwelt herstellte und eine zweite, die für ein Thermometer bestimmt war. An der Seite des Aufsatzes befand sich eine dritte Öffnung zur Verbindung mit einem Liebigkühler. Das andere Ende des Kühlers war mit einem weiteren Kolben verbunden, der durch einen Vakuumschlauch mit einer Wasserstrahlpumpe in Verbindung stand. Das Abjagen der Salzsäure erfolgte bei einer Temperatur von 25 - 30° C. Der hierzu nötige Unterdruck wurde durch die Wasserstrahlpumpe geschaffen. Nachdem fast bis zur Trockne eingedampft worden war, wurden 50 ml destilliertes Wasser in den Reaktionskolben gegeben und wiederum fast bis zur Trockne eingedampft. Dieser Vorgang wiederholte sich dreimal. Dadurch wurde der größte Teil der Salzsäure entfernt. Anschließend wurde die Analysenlösung vorsichtig mit einer 1 n Natronlauge neutralisiert, in einen 25 cm³ Erlenmeyerkolben geschüttet und bis auf 5 ml eingedampft. Der weitere Verlauf war der gleiche wie bei der Bestimmung des Aminosäurenstickstoffes.

IV. ERGEBNISSE DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN

1. Aminostickstoffgehalt der freien Aminosäuren

Für den Aminostickstoffgehalt in 10 ml Glaskörperflüssigkeit ergaben sich in 19 Bestimmungen beim Rind und 15 Bestimmungen beim Schwein folgende Werte:

TABELLE 4a

Glaskörperflüssigkeit des Rinderauges mg Aminostickstoff in 10 ml Glaskörperflüssigkeit	
0,312	0,310
0,270	0,302
0,290	0,332
0,328	0,300
0,276	0,318
0,302	0,258
0,274	0,272
0,278	0,340
0,312	0,286
0,332	

Durchschnitt: 0,299 mg

mittl. Abweichung: $\pm 0,024 \text{ mg} = \pm 8 \%$

Aus Tabelle 4a geht hervor, daß bei den eigenen Versuchen 10 ml Glaskörperflüssigkeit des Rinderauges im Durchschnitt 0,299 mg Aminostickstoff enthielten, in 100 ml wären demnach 2,99 mg. Die mittlere Abweichung beträgt $\pm 8 \%$, übersteigt also nicht die sonst bei biologischen Versuchen übliche Größenordnung.

In der Schweineglaskörperflüssigkeit waren 2,84 mg Aminostickstoff in 100 ml enthalten. Die mittlere Abweichung von $\pm 7 \%$ entspricht dem zuvor für den Rinderglaskörper Gesagten. Unter Berücksichtigung der mittleren Abweichung ergibt sich also für Rinder- und Schweineglaskörperflüssigkeit ein annähernd gleicher Aminostickstoffgehalt der freien Aminosäuren.

TABELLE 4b

Glaskörperflüssigkeit des Schweineauges mg Aminostickstoff in 10 ml Glaskörperflüssigkeit	
0, 256	0, 294
0, 270	0, 316
0, 284	0, 300
0, 308	0, 270
0, 294	0, 270
0, 300	0, 296
0, 260	0, 280
0, 262	

Durchschnitt: 0, 284 mg

mittl. Abweichung: $\pm 0, 019 \text{ mg} = \pm 7 \%$

2. Aminostickstoffgehalt der Peptide

Zur Bestimmung des Aminostickstoffgehaltes der Peptide wurden 10 Untersuchungen mit Rinderglaskörperflüssigkeit und 11 mit Schweineglaskörperflüssigkeit durchgeführt.

Da bei diesen Untersuchungen jedoch einige Zwischenfälle, vor allem während der langen Hydrolysenzeit, auftraten, waren davon nur 6 Untersuchungen von Rinderglaskörperflüssigkeit und 2 von Schweineglaskörperflüssigkeit verwertbar.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 5a und 5b zusammengefaßt:

TABELLE 5a

Glaskörperflüssigkeit des Rinderauges		
mg in 10 ml		
Aminostickst. der Aminosäuren	Aminostickst. d. Aminosäuren u. Peptide	Aminostickst. der Peptide
0, 302	0, 364	0, 062
0, 258	0, 362	0, 104
0, 272	0, 412	0, 140
0, 340	0, 448	0, 108
0, 286	0, 416	0, 130
0, 318	0, 498	0, 180

Durchschnitt an Aminostickstoff in den Peptiden: 0, 121 mg

mittlere Abweichung: $\pm 0, 040 \text{ mg} = \pm 33 \%$

TABELLE 5b

Glaskörperflüssigkeit des Schweineauges		
mg in 10 ml		
Aminostickst. der Aminosäuren	Aminostickstoff d. Aminosäuren u. Peptide	Aminostickstoff der Peptide
0,316	0,356	0,040
0,270	0,352	0,082

6 Untersuchungen des Aminostickstoffgehaltes der Peptide der Glaskörperflüssigkeit von Rinderaugen ergaben einen Durchschnittswert von 1,21 mg in 100 ml, so daß also der Aminostickstoffgehalt der freien Aminosäuren etwa 2 1/2mal so hoch ist wie der Aminostickstoffgehalt der Peptide. Bezüglich des Aminostickstoffgehaltes der Peptide in der Glaskörperflüssigkeit des Schweineauges fanden sich bei nur 2 verwertbaren Analysen niedrigere Werte als beim Rind. Die Untersuchungen ergaben Werte von 0,040 bzw. 0,082 mg Aminostickstoff in 10 ml Glaskörperflüssigkeit.

Die Zahl dieser nur orientierenden Versuche ist jedoch noch zu niedrig, um hieraus einen verbindlichen Schluß bezüglich eines geringeren Aminostickstoffgehaltes der Peptide bei Schweineglaskörpern abzuleiten.

V. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Zum Vergleich mit den eigenen Ergebnissen seien diejenigen von Wootton und Mitarbeitern und Cohen und Mitarbeitern noch einmal angeführt. Wootton und Mitarbeiter untersuchten den Gehalt der Glaskörperflüssigkeit des Rinderauges an freien Aminosäuren. Zum Vergleich mit den eigenen Untersuchungen muß aus den von ihnen gefundenen Aminosäuren der Aminostickstoffgehalt berechnet werden.

Es ergibt sich, daß Probe I 1,532 mg, Probe II 1,354 mg und Probe III 1,906 mg Aminostickstoff in 100 ml Glaskörperflüssigkeit enthält. Aus diesen Ergebnissen ist zu ersehen, daß die Werte der eigenen Untersuchungen mit 2,99 mg Aminostickstoff in 100 ml Rinderglaskörperflüssigkeit bedeutend höher liegen. Da die von Wootton und Mitarbeitern für die Aminosäuren gefundenen Werte in den einzelnen Proben zum Teil recht erheblich voneinander abweichen, könnte daran gedacht werden, daß vielleicht in manchen Analysen nicht der Gesamtgehalt an einzelnen Aminosäuren völlig erfaßt wurde. Weiterhin fällt auf, daß Malatesta bei der qualitativen Bestimmung der freien

Aminosäuren in der Glaskörperflüssigkeit von Rinderaugen eine Anzahl Aminosäuren angegeben hat, die in der von Wootton und Mitarbeitern aufgeführten Tabelle nicht aufzufinden sind. Diese beiden Umstände dürften erklären, weshalb die Werte von Wootton und Mitarbeitern so niedrig liegen, während in den eigenen Untersuchungen ein wesentlich höherer Aminostickstoffgehalt der freien Aminosäuren gefunden wurde, was den tatsächlichen Gegebenheiten offenbar eher entspricht.

Der Vergleich mit den von Cohen und Mitarbeitern angegebenen Werten ergibt hinsichtlich des Aminostickstoffgehaltes der Schweineglaskörperflüssigkeit praktisch vollkommene Übereinstimmung mit den eigenen Resultaten. Cohen und Mitarbeiter führten einen Wert von 2,8 mg Aminostickstoff in 100 ml Glaskörperflüssigkeit an, die eigenen Untersuchungen ergaben einen Durchschnittswert von 2,84 mg Aminostickstoff in 100 ml Glaskörperflüssigkeit. Hinsichtlich des Aminostickstoffgehaltes in der Glaskörperflüssigkeit des Rinderauges weichen die Ergebnisse allerdings nicht unerheblich voneinander ab. Cohen und Mitarbeiter geben einen Gehalt von 1,8 mg Aminostickstoff in 100 ml Glaskörperflüssigkeit an, während die eigenen Untersuchungen einen Durchschnittswert von 2,99 mg in 100 ml ergaben.

Untersuchungen des Aminostickstoffgehaltes der Peptide sind bisher nicht bekannt; es bestanden daher keine Vergleichsmöglichkeiten.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Es wurde der Aminostickstoff der freien Aminosäuren und der Peptide in der Glaskörperflüssigkeit von Rinder- und Schweineaugen quantitativ bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten nach einem Verfahren, das van Slyke und Mitarbeiter entwickelten. Zur Bestimmung des Aminostickstoffgehaltes der Glaskörperflüssigkeit von Rinder- und Schweineaugen erfolgten 19 Untersuchungen von Rinderglaskörperflüssigkeit und 15 von Schweineglaskörperflüssigkeit. Der Gehalt an Aminostickstoff in der Glaskörperflüssigkeit von Rinderaugen betrug im Durchschnitt 2,99 mg Aminostickstoff in 100 ml. Glaskörperflüssigkeit. Die Bestimmung des Aminostickstoffgehaltes in der Glaskörperflüssigkeit des Schweineauges ergab einen Durchschnittswert von 2,84 mg in 100 ml. Die beiden Werte sind also annähernd gleich.

Sechs Untersuchungen des Aminostickstoffgehaltes der Peptide der Glaskörperflüssigkeit von Rinderaugen führten zu einem Durchschnittswert von 1,21 mg in 100 ml, während bei zwei orientierenden Untersuchungen der Glaskörperflüssigkeit von Schweineaugen die entsprechenden Werte 0,40 - bzw. 0,82 mg betrugen.

Zum Vergleich mit den eigenen Untersuchungen lagen diejenigen von Cohen und Mitarbeitern und Wootton und Mitarbeitern vor. Cohen und Mitarbeiter führten einen Wert von 2,8 mg Aminostickstoff in 100 ml Schweineglaskörperflüssigkeit und von 1,8 mg in 100 ml Rinderglaskörperflüssigkeit an. Es besteht also hinsichtlich des Aminostickstoffgehaltes der Schweineglaskörperflüssigkeit praktisch vollkommene Übereinstimmung mit den eigenen Resultaten, während die Bestimmung des Aminostickstoffgehaltes der Rinderglaskörperflüssigkeit bei den eigenen Untersuchungen einen wesentlich höheren Wert ergab.

Zum Vergleich mit den Untersuchungen von Wootton und Mitarbeitern mußte aus den von ihnen gefundenen Aminosäurewerten der Aminostickstoffgehalt berechnet werden. Es ergab sich dabei, daß Probe I 1,532 mg, Probe II 1,354 mg und Probe III 1,906 mg Aminostickstoff in 100 ml Glaskörperflüssigkeit enthält. Aus diesen Ergebnissen ist zu ersehen, daß die Werte der eigenen Untersuchung mit 2,99 mg Aminostickstoff in 100 ml Glaskörperflüssigkeit bedeutend höher sind.

Untersuchungen des Aminostickstoffgehaltes der Peptide sind bisher nicht bekannt; es bestanden daher keine Vergleichsmöglichkeiten.

LITERATURVERZEICHNIS

- Cohen, M.,
Killian, J. A. and
Metzer, N. Studies in the chemistry of the humors of animal eyes, and a comparison of their composition with that of blood and spinal fluid. Contribution to Ophthalmic Science. Jackson birthday-Bd. 216-228 (1926). Ref. Zbl. Ophthalm. 17, 650 (1927).
- Halwer, M. and
Nutting, G.C. Cysteine Losses Resulting from Acid Hydrolysis of Proteins.
J. biol. Chem. 166, 521 (1946)
- Kotake, T. Zur Frage der Tryptophanzersetzung bei der Säurehydrolyse von Eiweiß.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 270, 44 (1941)
- Malatesta, C. Studio cromatografico degli aminoacidi liberi nei liquidi endoculari, nel cristallino e nel sangue di bue.
Nota II: Gli aminoacidi liberi nel acqueo et nel vitreo. Boll. Ocul. 31, 691-694 (1952).
Ref. Zbl. Ophthalm. 60, 119 (1953)
Nota IV: Considerazioni sui rapporti tra aminoacidi liberi del sangue e quelli contenuti sui liquidi endoculari e nel cristallino.
Boll. Ocul. 31, 765-768 (1952)
Ref. Zbl. Ophthalm. 60, 262 (1953)
- Pririe and Van
Heyningen Biochemistry of the eye.
Oxford, Blackwell Scient. 1956
- Tristram G.R. The Application of Partition Chromatography to the Determination of Monoamino-Acids in Proteins
Biochem. J. 40, 721 (1946)
- Van Slyke,
Mac Fayden and
Hamilton P J. biol. Chem. 141, 671 (1941)
- Weve Augenärztlicher Fortbildungskurs
München 1957

Wieland, Th.

Die Trennung und Bestimmung der natürlichen Aminosäuren.

Fortschr. chem. Forsch. 1, 211-291 (1949)

Wootton, J.F.,

Young, G. and

Williams, H.

Chromatographic Investigation of free amino acid constituents of vitreous humor.

Archives of Ophthalmology 51, 589-592 (1954)

Herrn Privatdozenten Dr. med. Hans-Joachim
Küchle danke ich für die Überlassung des
Themas.

Herrn Dr. Krueger verdanke ich vielfache
Anregungen bei der Durchführung der wissen-
schaftlichen Untersuchungen.

Besonders sei an dieser Stelle auch
Herrn Professor Dr. Rohrschneider für
sein Entgegenkommen gedankt; ich durfte
für die Dauer der Versuche das physiologisch-
chemische Labor der Universitäts-Augenklinik
benutzen.

L E B E N S L A U F

Am 1. Mai 1933 wurde ich als Sohn des Werkmeisters Wilhelm Kalfhaus und seiner Frau Johanna, geb. Hase, in Kamen geboren. Von 1939 bis 1941 besuchte ich die Volksschule in Kamen und anschließend bis 1943 die Volksschule in Lünen. 1943 kam ich auf das Freih. v. Stein-Gymnasium in Lünen. Dort legte ich im Frühjahr 1953 die Reifeprüfung ab. Anschließend begann ich an der Universität Münster mit dem Medizinstudium. In Münster bestand ich dann nach dem SS 1955 die ärztliche Vorprüfung. Von den klinischen Semestern studierte ich ein Semester in Münster, zwei in Wien und drei in München. Hier bestand ich am 3. Dezember 1958 die ärztliche Prüfung. Seit Dezember 1959 bin ich als Medizinal-Assistent auf der chirurgischen Abteilung des St. Laurentius Stiftes in Waltrop.

